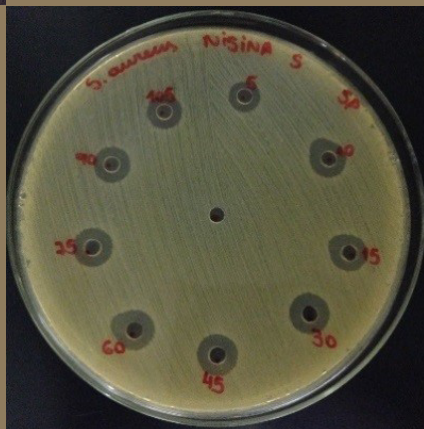
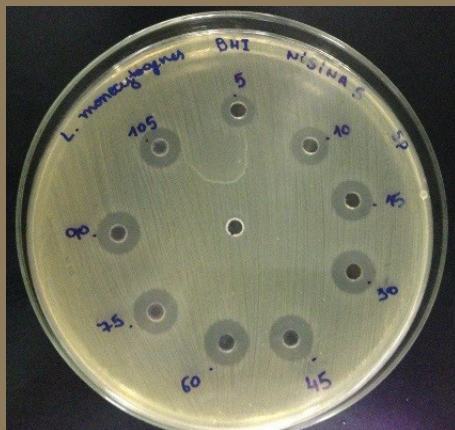


## Atividade Antimicrobiana de Filme e Revestimento de Quitosana Incorporados de Nisina sobre Bactérias Patogênicas



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 124***

## **Atividade Antimicrobiana de Filme e Revestimento de Quitosana Incorporados de Nisina sobre Bactérias Patogênicas**

*Selene Daiha Benevides  
Maria de Fatima Borges  
Maria do Socorro Rocha Bastos  
Amauri Rosenthal  
Carlos Ruan Vieira de Sousa  
Sarah Maria Frota Silva  
Camila Mota Martins  
Bruna Santana das Chagas  
Maria Karolina de Araújo Barroso*

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Fortaleza, CE  
2017

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição:**

Embrapa Agroindústria Tropical  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
www.embrapa.br/agroindustria-tropical  
www.embrapa.br/fale-conosco

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Secretária-administrativa: *Eveline de Castro Menezes*

Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto Lopes Serrano,  
Marlon Vagner Valentim Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia  
Costa Cid, Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Ana Elisa Galvão Sidrim*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização: *Rita de Cassia Costa Cid*

Fotos da capa: *Selene Daiha Benevides*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

**1ª edição**

On-line (2017)

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroindústria Tropical

---

Atividade antimicrobiana de filme e revestimento de quitosana incorporados de nisina sobre bactérias patogênicas / Selene Daiha Benevides... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2017.

20 p. : il. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 124).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Polímero biodegradável. 2. Antimicrobiano. 3. Embalagem ativa. I. Benevides, Selene Daiha. II. Borges, Maria de Fatima. III. Bastos, Maria do Socorro Rocha. IV. Rosenthal, Amauri. V. Sousa, Carlos Ruan Vieira de. VI. Silva, Sarah Maria Frota. VII. Martins, Camila Mota. VIII. Chagas, Bruna Santana das. IX. Barroso, Maria Karolina de Araújo. X. Série.

---

CDD 547.7

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>8</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>12</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>18</b>
<b>Referências .....</b>	<b>19</b>

# Atividade Antimicrobiana de Filme e Revestimento de Quitosana Incorporados de Nisina sobre Bactérias Patogênicas

**Selene Daiha Benevides<sup>1</sup>**

**Maria de Fatima Borges<sup>2</sup>**

**Maria do Socorro Rocha Bastos<sup>3</sup>**

**Amauri Rosenthal<sup>4</sup>**

**Carlos Ruan Vieira de Sousa<sup>5</sup>**

**Sarah Maria Frota Silva<sup>6</sup>**

**Camila Mota Martins<sup>7</sup>**

**Bruna Santana das Chagas<sup>8</sup>**

**Maria Karolina de Araújo Barroso<sup>9</sup>**

## Resumo

Filmes e revestimentos à base de biopolímeros têm sido desenvolvidos como embalagem biodegradável e renovável. A quitosana é um biopolímero produzido a partir de cascas de crustáceos que apresenta características favoráveis à formação de filmes e revestimentos. Ao ser incorporado um bioativo na solução filmogênica, esta pode tornar-se uma embalagem ativa com poder de redução ou inibição de crescimento microbiano. A nisina, peptídeo produzido a partir de estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, tem sido utilizada como antimicrobiano

<sup>1</sup> Engenheira de alimentos, doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, selene.benevides@embrapa.br

<sup>2</sup> Farmacêutica, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, maria.fatima@embrapa.br

<sup>3</sup> Engenheira de alimentos, doutora em Ciências e Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, socorro.bastos@embrapa.br

<sup>4</sup> Engenheiro de alimentos, doutor em Food Biotechnology and Bioengineering, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, amauri.rosenthal@embrapa.br

<sup>5</sup> Graduando em Engenharia de Alimentos, bolsista do CNPq, Fortaleza, CE, ruan\_asdf@hotmail.com

<sup>6</sup> Engenharia de alimentos, mestranda em Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, sarahfrota1@hotmail.com

<sup>7</sup> Engenharia de alimentos, mestranda em Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, kmila\_mota@hotmail.com

<sup>8</sup> Engenheira de alimentos, bolsista DTI CNPq/Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, brunasantana\_chagas@hotmail.com

<sup>9</sup> Graduanda em Engenharia de Alimentos, bolsista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, mariakarolinaaraujo@yahoo.com.br

em embalagens biopoliméricas a fim de prolongar a vida de prateleira dos alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana da nisina incorporada em revestimentos e filmes à base de quitosana sobre o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, visando utilizá-los como embalagem ativa para alimentos. A atividade antimicrobiana do filme e do revestimento de quitosana incorporados com nisina foi avaliada pelo método de difusão em ágar contra o crescimento dos microrganismos citados. O filme de quitosana com nisina apresentou inibição antimicrobiana somente na área de contato com o ágar. O revestimento com nisina apresentou atividade antimicrobiana em todas as concentrações de nisina avaliadas, apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), indicando seu potencial como embalagem ativa para alimentos.

Termos para indexação: polímero biodegradável, antimicrobiano, embalagem ativa.

# Antimicrobial Activity of Film and Coating of Chitosan Incorporated of Nisin on Pathogenic Bacteria

## Abstract

*Biopolymer films and coatings have been developed as biodegradable and renewable packaging. Chitosan is a biopolymer produced from crustacean shells and has favorable characteristics for films and coatings formation. When a bioactive is incorporated to the film forming solution, this can become an active packaging that can reduce or inhibit the microbial growth. Nisin, a peptide produced from strains of Lactococcus lactic subsp. lactis, has been used as an antimicrobial in biopolymer packaging materials in order to prolong food shelf life. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of nisin incorporated to chitosan coatings and films on the growth of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus to be used as food active packaging. The antimicrobial activity of the chitosan films and coatings incorporated with nisin was evaluated by agar diffusion method against growth of microorganisms mentioned. The chitosan film with nisin presented antimicrobial activity only in the contact area of the film with the agar. The coating with nisin showed antimicrobial activity in all evaluated nisin concentrations, with significant differences ( $p < 0.05$ ), indicating their potential as active packaging for foods.*

*Index terms: biodegradable polymer, antimicrobial, active packaging.*

## Introdução

A contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos e/ou deterioradores pode acontecer em qualquer etapa do desenvolvimento do produto, mesmo após embalado. Uma das tecnologias mais dinâmicas atualmente utilizadas para aumentar a vida de prateleira e garantir a segurança microbiológica dos alimentos é a embalagem ativa.

A embalagem ativa é um sistema de embalagem que incorpora componentes desejáveis que são liberados aos alimentos embalados ou absorvem substâncias indesejáveis dos alimentos, visando prolongar a vida de prateleira e manter ou melhorar o estado dos alimentos embalados (LUXEMBURGO, 2009). Desempenha também papel ativo na conservação e na qualidade dos alimentos durante a comercialização, além de fornecer barreira a fatores externos prejudiciais (PEREIRA de ABREU et al., 2012). A crescente procura dos consumidores por alimentos sem conservantes químicos tem estimulado esforços para pesquisas na área de embalagens biodegradáveis bioativas.

A quitosana é um dos biopolímeros mais utilizados para elaboração de filmes e revestimentos e com mais perspectiva de sucesso por possuir boas propriedades formadoras de filme, ser sustentável e biocompatível. Derivada da desacetilação da quitina, é obtida a partir de resíduos de cascas de crustáceos, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza depois da celulose (RIVERO et al., 2009; AIDER, 2010; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2011). Pesquisadores afirmam que a quitosana possui atividade antimicrobiana natural explicada pelas moléculas carregadas positivamente, que interagem com as bactérias carregadas negativamente, causando ruptura nas células (COMA et al., 2003; ZIVANOVIC et al., 2005). A sua eficácia bactericida depende de fatores como a espécie do microrganismo; fatores intrínsecos como o peso molecular e a concentração; estado físico, se dispersão ou filme; e condição ambientais como pH e temperatura (KONG et al., 2010).

A quitosana tem sido utilizada como veículo para incorporação de aromatizantes, corantes, antioxidantes e antimicrobianos na elaboração de filmes e revestimentos, tornando-se embalagens potencialmente



bioativas para aplicação em frutas, legumes, grãos, queijos e carnes (SINHA et al., 2014).

Os filmes e revestimentos de quitosana, que já têm potenciais propriedades antimicrobianas, têm seu potencial ativo (antimicrobiano) aumentado ao ser incorporados de algum antimicrobiano na solução base filmogênica. A nisina é um antimicrobiano natural muito utilizado como aditivo em alimentos, assim como em suas embalagens. A nisina é produzida a partir de estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e é reconhecida como segura para aplicações em alimentos pela Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) Expert Committee on Food Additives (FDA, 1988). É um polipeptídeo hidrofóbico e catiônico, apresenta atividade antimicrobiana para uma gama de bactérias Gram-positivas, porém pouca ou nenhuma atividade para bactérias Gram-negativas, leveduras e bolores (MARTINS et al., 2010).

Basicamente, o tipo do alimento é que define o tipo da embalagem a ser utilizada, se filme ou revestimento. A principal diferença entre os dois é que o revestimento é aplicado na forma líquida sobre os alimentos, geralmente por imersão do produto na dispersão. O filme é uma fina camada previamente formada a partir da evaporação do solvente (à temperatura ambiente ou por secagem em estufa), sendo destacado do substrato para embalar o alimento (FALGUERA et al., 2011).

Este estudo teve o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de filme e revestimento à base de quitosana incorporados de nisina sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, visando utilizá-los como embalagem ativa para alimentos.

## Material e Métodos

### Material

As espécies bacterianas utilizadas neste estudo foram *Listeria monocytogenes* ATCC 3309 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtidas da Microbiologics, Sant Cloud, EUA.

A nisina e a quitosana (grau de desacetilação de 86,30% e pH 7,9) foram obtidas da Sigma, St. Louis, MO, EUA.

O caldo infusão de cérebro e coração e o ágar Mueller Hinton utilizados foram obtidos da Becton Dickinson, EUA.

O ácido acético glacial utilizado foi da Synth®, Diadema, Brasil e o glicerol e o Tween 80 foram obtidos da Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Brasil.

## **Métodos**

### ***Avaliação antimicrobiana da nisina***

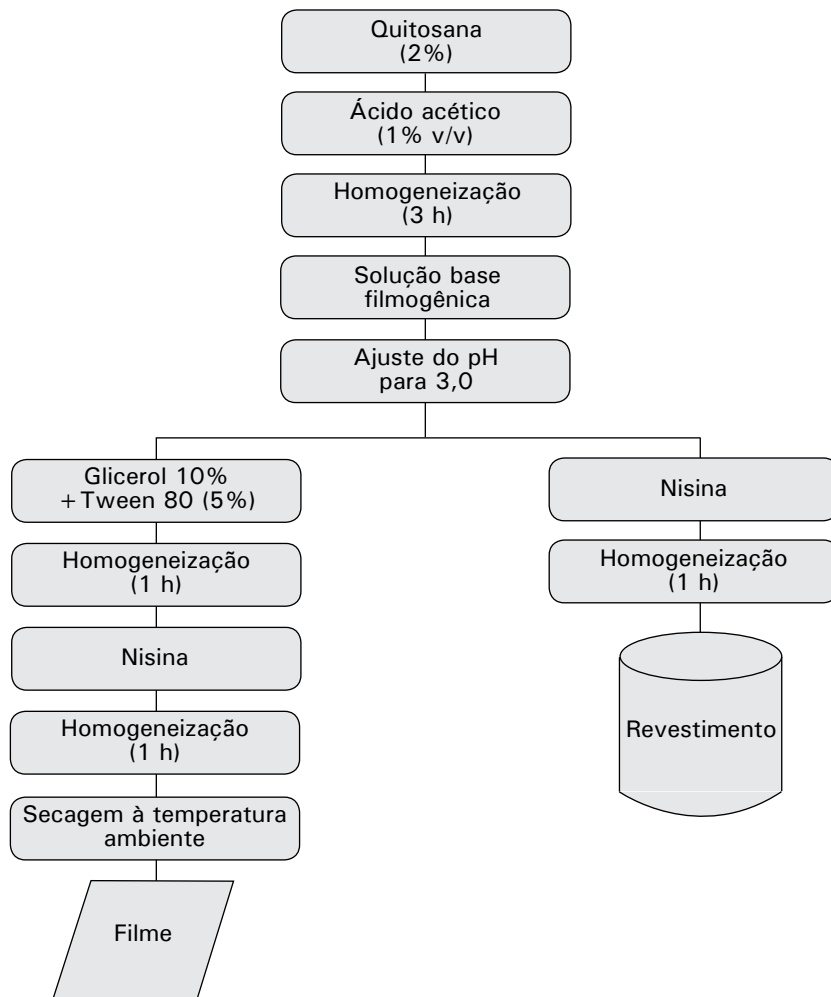
A nisina teve sua atividade antimicrobiana avaliada por meio de soluções preparadas com água deionizada e nas seguintes concentrações de nisina: 5.000, 10.000, 15.000, 30.000, 45.000, 60.000, 75.000, 90.000 e 105.000 UI/mL. A avaliação foi realizada pelo método de difusão em ágar de acordo com a norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana recomendada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2005).

As cepas de *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram cultivadas em caldo infusão de cérebro e coração a 35 °C/24 h, e suas concentrações foram ajustadas para 10<sup>6</sup> células/mL. Em seguida, as culturas de *L. monocytogenes* e de *S. aureus* foram inoculadas na superfície de ágar infusão de cérebro e coração e ágar Mueller Hinton, respectivamente, ambas com auxílio de swab estéril.

Com um perfurador estéril, foram realizados poços de 5 mm de diâmetro interno, sendo depositados 60 µL de cada concentração de solução de nisina, uma em cada poço. Após incubação a 35-37 °C/24 horas, foram medidos os diâmetros (mm) dos halos de inibição da nisina sobre o crescimento dos microrganismos. Os ensaios foram realizados em três repetições.

### ***Elaboração do filme e do revestimento de quitosana incorporados com nisina***

O filme e o revestimento de quitosana incorporados com nisina foram elaborados seguindo metodologia de Santiago-Silva et al. (2009), e o fluxograma de elaboração segue as etapas abaixo, conforme Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma de elaboração do filme e revestimento de quitosana incorporados com nisina.

Para o filme, a solução base filmogênica de quitosana foi preparada solubilizando-a a 2% (p/v) em ácido acético glacial (1% v/v) e homogeneizada por 3 h em agitador magnético. Em seguida, adicionou-se glicerol (10% v/v) e Tween 80 (5% v/v). A solução foi adicionada da nisina nas mesmas concentrações (5.000, 10.000, 15.000, 30.000, 45.000, 60.000, 75.000, 90.000 e 105.000 UI/mL) avaliadas

anteriormente, diluídas em 2 mL de ácido acético P.A., e o pH foi ajustado para 3. Agitou-se por mais 1 h até completa homogeneização. A solução foi vertida em placa de vidro previamente sanitizada com álcool 70% e espalhada com auxílio de uma barra metálica em aço inoxidável, à espessura de 1 mm, para a formação do filme. Após a completa evaporação do solvente à temperatura ambiente ( $24 \pm 1$  °C), o filme foi removido da placa e acondicionado em dessecador. Foi elaborado também o filme controle (sem nisina). Os ensaios foram realizados em três repetições.

O revestimento foi obtido seguindo basicamente o mesmo processo para o filme até a etapa de obtenção da solução filmogênica, sem a adição de glicerol e Tween (Figura 1). Ao finalizar o processo para obtenção do revestimento, este foi utilizado no mesmo instante na avaliação da atividade antimicrobiana. Os ensaios foram realizados em três repetições.

### ***Atividade antimicrobiana do filme e do revestimento de quitosana***

A avaliação antimicrobiana do filme de quitosana com nisina foi realizada depositando-se discos (1,5 cm de diâmetro) do filme sobre a superfície de ágar Mueller Hinton e ágar infusão de cérebro e coração inoculados com suspensões de células (10<sup>6</sup> UFC/mL) de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. As placas foram incubadas a 35 °C/24 h, e a atividade antimicrobiana foi determinada pela medida do diâmetro do halo de inibição (mm) sobre o crescimento dos microrganismos em volta de cada disco do filme. A avaliação foi realizada com as concentrações de nisina de 5.000, 10.000, 15.000, 30.000, 45.000, 60.000, 75.000, 90.000 e 105.000 UI/mL. Os ensaios foram realizados em três repetições.

A avaliação antimicrobiana do revestimento foi realizada com as mesmas concentrações de nisina citadas anteriormente. Depositaram-se 60 µL de cada solução base filmogênica de quitosana com nisina em poços de 5 mm de diâmetro sobre a superfície do ágar Mueller Hinton e ágar de infusão de cérebro e coração inoculados com

suspensões de células (106 UFC/mL) de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. As placas foram incubadas a 35 °C/24 h, e a atividade antimicrobiana foi determinada pela medida do diâmetro do halo de inibição (mm) do crescimento dos microrganismos em volta de cada poço. Os ensaios foram realizados em três repetições.

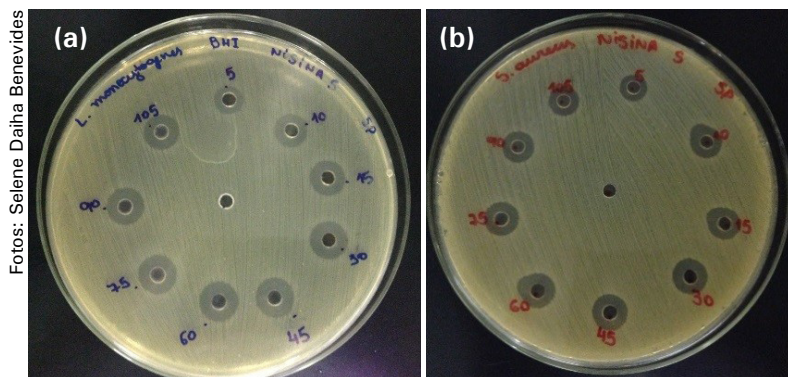
## Análise estatística

Os resultados do experimento foram analisados estatisticamente por análise de variância dos efeitos principais (microrganismos e concentrações de nisina); da comparação das médias dos tratamentos constituídos pelas concentrações de nisina e pelos microrganismos. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa utilizado foi o StatSoft.Statistica.v10.

## Resultados e Discussão

### Atividade antimicrobiana das soluções de nisina

As soluções de nisina apresentaram atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas (5.000, 10.000, 15.000, 30.000, 45.000, 60.000, 75.000, 90.000, 105.000 UI/mL), inibindo o crescimento das bactérias *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Figura 2).



**Figura 2.** Halos de inibição (mm) das soluções de nisina (5.000, 10.000, 15.000, 30.000, 45.000, 60.000, 75.000, 90.000, 105.000 UI/mL) sobre o crescimento de *L. monocytogenes* (a) e *S. aureus* (b). Controle no poço do centro da placa.

Os diâmetros dos halos de inibição variaram de  $12,0 \pm 0,0$  a  $15,00 \pm 0,0$  para *S. aureus* e de  $12,0 \pm 0,0$  a  $18,0 \pm 1,7$  para *L. monocytogenes* (Tabela 1), variando em função da concentração de nisina.

**Tabela 1.** Valores médios dos diâmetros (mm) dos halos de inibição produzidos pelas diferentes concentrações de soluções de nisina sobre o crescimento microbiano.

Concentração (UI) <sup>(1)</sup>	Halo de inibição (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
5.000	$12,0 \pm 0,0^b$	$12,0 \pm 0,0^b$
10.000	$14,3 \pm 0,6^a$	$14,7 \pm 0,6^{ab}$
15.000	$14,3 \pm 0,6^a$	$15,7 \pm 0,6^a$
30.000	$14,7 \pm 0,6^a$	$17,3 \pm 1,1^a$
45.000	$15,0 \pm 1,0^a$	$18,0 \pm 1,7^a$
60.000	$14,7 \pm 0,6^a$	$18,0 \pm 1,7^a$
75.000	$14,7 \pm 0,6^a$	$17,0 \pm 1,7^a$
90.000	$14,7 \pm 0,6^a$	$16,3 \pm 1,1^a$
105.000	$14,7 \pm 0,6^a$	$15,3 \pm 0,6^{ab}$

<sup>(1)</sup> UI: Unidade Internacional

Médias com letras iguais na mesma coluna indica que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

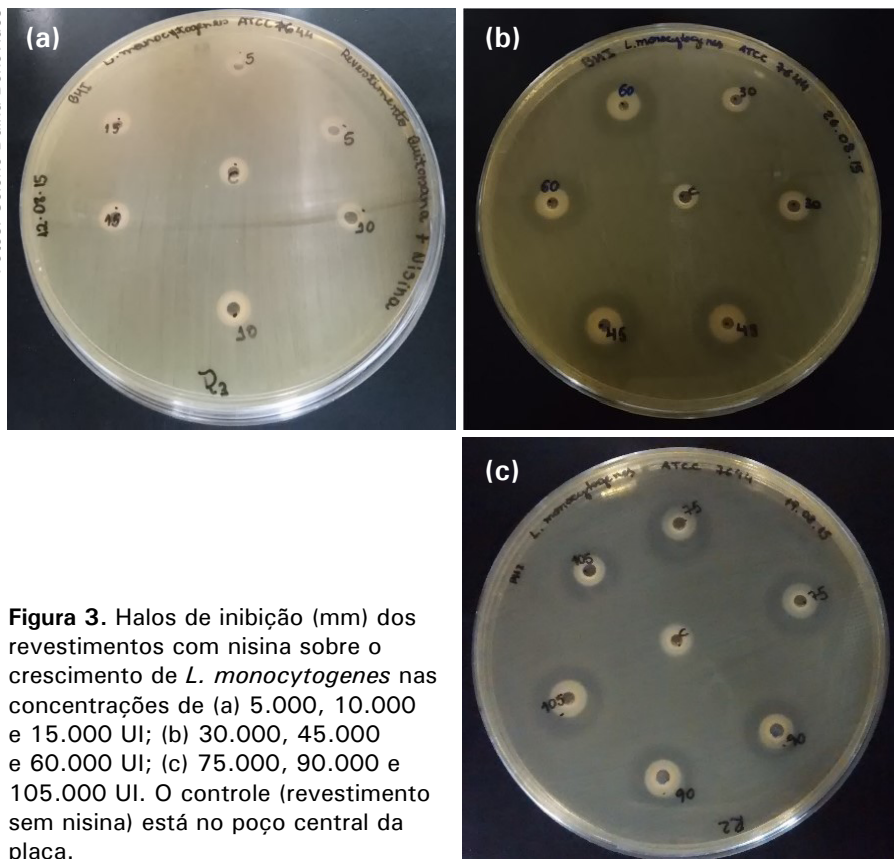
A atividade antimicrobiana da concentração de 5.000 UI/mL de nisina sobre o crescimento *S. aureus* apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das demais concentrações. A partir de 10.000 UI/mL, não houve diferença significativa entre as concentrações de nisina.

Os resultados indicaram que, apesar de a nisina possuir potencial antimicrobiano, parece possuir ação limitada, observada por meio do diâmetro dos halos que não foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de nisina. Segundo Melo et al. (2005) a ação antimicrobiana da nisina é limitada, indicando a necessidade da realização de estudos visando conhecer a tecnologia de barreiras ou alterar as condições do meio onde a nisina pode atuar.

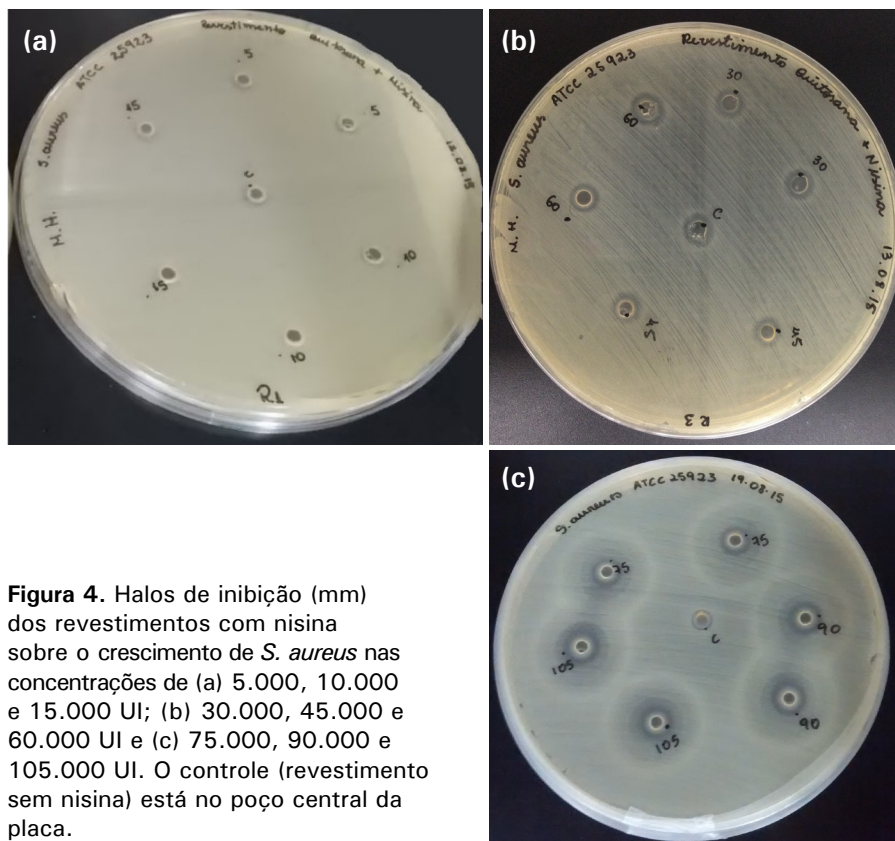
## Atividade antimicrobiana das embalagens ativas de quitosana com nisina

O efeito antimicrobiano dos diferentes revestimentos de quitosana com nisina sobre o crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, pode ser observado nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Fotos: Selene Daiha Benevides



**Figura 3.** Halos de inibição (mm) dos revestimentos com nisina sobre o crescimento de *L. monocytogenes* nas concentrações de (a) 5.000, 10.000 e 15.000 UI; (b) 30.000, 45.000 e 60.000 UI; (c) 75.000, 90.000 e 105.000 UI. O controle (revestimento sem nisina) está no poço central da placa.



**Figura 4.** Halos de inibição (mm) dos revestimentos com nisina sobre o crescimento de *S. aureus* nas concentrações de (a) 5.000, 10.000 e 15.000 UI; (b) 30.000, 45.000 e 60.000 UI e (c) 75.000, 90.000 e 105.000 UI. O controle (revestimento sem nisina) está no poço central da placa.

O efeito antimicrobiano da nisina nos revestimentos sobre o crescimento *S. aureus* e *L. monocytogenes* tiveram variação em função da concentração de nisina, apresentando halos com diâmetros de  $7,5 \pm 1,4$  mm a  $11,3 \pm 1,2$  mm e de  $9,8 \pm 0,4$  mm a  $23,0 \pm 1,5$  mm, respectivamente, conforme Tabela 2.



**Tabela 2.** Valores médios dos diâmetros (mm) dos halos de inibição resultantes da ação da nisina sobre o crescimento microbiano nos revestimentos.

Concentração (UI) <sup>(1)</sup>	Diâmetro do halo de inibição (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Controle (sem nisina)	7,7 ± 0,8 <sup>c</sup>	10,5 ± 0,5 <sup>c</sup>
5.000	8,0 ± 0,0 <sup>bc</sup>	9,8 ± 0,4 <sup>c</sup>
10.000	7,5 ± 1,4 <sup>c</sup>	10,2 ± 0,4 <sup>c</sup>
15.000	7,7 ± 0,8 <sup>c</sup>	11,0 ± 0,0 <sup>c</sup>
30.000	7,8 ± 0,8 <sup>c</sup>	20,0 ± 3,2 <sup>ab</sup>
45.000	8,3 ± 0,5 <sup>bc</sup>	19,8 ± 2,2 <sup>ab</sup>
60.000	9,7 ± 0,5 <sup>ab</sup>	22,0 ± 2,4 <sup>ab</sup>
75.000	11,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	23,0 ± 1,5 <sup>a</sup>
90.000	10,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	20,8 ± 1,7 <sup>ab</sup>
105.000	10,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	19,3 ± 2,5 <sup>b</sup>

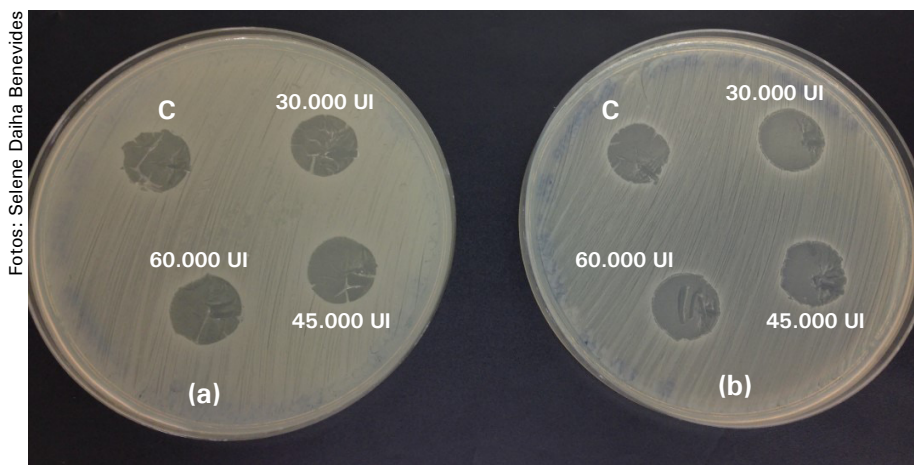
<sup>(1)</sup>UI: Unidade InternacionalMédias com letras iguais na mesma coluna indica que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Para *S. aureus*, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o diâmetro dos halos do controle até a concentração de 45.000 UI. O mesmo aconteceu de 60.000 UI até 105.000 UI, que apresentaram os maiores halos de inibição, com diâmetros variando de  $9,7 \pm 0,5$  mm a  $11,3 \pm 1,2$  mm.

Para *L. monocytogenes* o diâmetro dos halos foram maiores quando comparados aos obtidos para *S. aureus*, indicando maior efeito antimicrobiano da nisina sobre essa bactéria. O controle não diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) de 5.000 a 15.000 UI. As concentrações de 30.000 a 90.000 UI/mL apresentaram maiores halos de inibição, mas não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ). O efeito antimicrobiano da nisina em relação a sua concentração também foi constatado por Pranoto et al. (2005) em filmes de quitosana incorporados com

diferentes concentrações de nisina (51.000, 102.000, 153.000 e 204.000 UI) sobre *Escherichia coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Bacillus cereus*, indicando que há um limite de difusão do antimicrobiano no filme.

Os filmes controle e de quitosana com nisina apresentaram halo de inibição do crescimento microbiano somente na área de contato com o ágar. Os resultados para as concentrações de 30.000, 45.000 e 60.000 UI são apresentados na Figura 5.



**Figura 5.** Inibição do crescimento de (a) *L. monocytogenes* e (b) *S. aureus* nos filmes de quitosana incorporados com nisina nas concentrações de 30.000, 45.000 e 60.000 UI. (C) Filme controle (sem nisina).

A ausência do halo de inibição além da superfície de contato com os filmes pode ser atribuída à não difusão da nisina no ágar, ficando fisicamente aprisionada à matriz do filme. Leceta et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes à base de quitosana e também constataram que não houve formação de zona de inibição além da superfície de contato com o ágar, independentemente do peso molecular da quitosana utilizada, do conteúdo de glicerol, do tipo de amostra (revestimento ou filme) e das condições de secagem das amostras (temperatura ambiente ou estufa).

O filme sofreu hidratação devido à umidade contida no ágar, causando intumescimento, e formação de uma barreira de difusão com consequente redução da liberação do composto ativo. O mesmo aconteceu com os filmes de quitosana incorporados com nisina sobre o desenvolvimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes* avaliados por Baumgartner et al. (2005) e Yadav et al. (2011). Os autores observaram que a atividade antimicrobiana da nisina não apresentou diferença significativa na cinética de liberação. A umidade mais elevada do meio de cultura pode ter hidratado o biopolímero, resultando em dilatação e redução da capacidade de reter a nisina. Os filmes controle apresentaram halo de inibição somente na área de contato.

## Conclusões

O revestimento de quitosana incorporado com nisina apresenta melhor atividade antimicrobiana nas concentrações de 60.000 a 75.000 UI/mL sobre o crescimento de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, indicando seu potencial para ser utilizado como embalagem ativa de alimentos.

# Referências

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43 n. 6, p. 837-842, 2010.

BAUMGARTNER, S.; LAHAJNAR, G.; SEPE, A.; KRISTL, J. Quantitative evaluation of polymer concentration profile during swelling of hydrophilic matrix tablets using <sup>1</sup>H NMR and MRI methods. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 299-306, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**: 15º suplemento informativo. Pennsylvania, 2005. (Document, M100-S15).

COMA, V.; DESCHAMPS, A.; MARTIAL-GROS, A. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-Antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 9, p. 2788-2792, 2003.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 292-303, 2011.

FDA. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Federal Register**, v. 53, p. 11247-11251, 1988.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; IBARBURU, I.; DUEÑAS, M.T.; CABA, K. DE LA. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 889-899, 2013.

LUXEMBURGO. Regulamento (CE) nº 450/2009 da Comissão de 29 de maio. Relativo aos materiais e objetos activos e inteligentes destinados a entrar em contato com os alimentos. **Diário Oficial da União Europeia**, Luxemburgo, 30 maio. 2009. L 135, p. 3-11. Edição em língua portuguesa. Disponível em: <[http://www.vetbiblios.pt/LEGISLACAO\\_TECNICA/MATERIAIS\\_OBJECTOS\\_EM\\_CONTACTO\\_COM\\_GENEROS\\_ALIMENTICIOS/Generalidades/Regulamento\\_450-2009\\_29-05.pdf](http://www.vetbiblios.pt/LEGISLACAO_TECNICA/MATERIAIS_OBJECTOS_EM_CONTACTO_COM_GENEROS_ALIMENTICIOS/Generalidades/Regulamento_450-2009_29-05.pdf)>. Acesso em: 7 maio 2016.

MARTINS, J.; CERQUEIRA, M.; SOUZA, B.; CARMO AVIDES, M.; VICENTE, A. Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1884-1891, 2010.

MELO, N. R. de; SOARES, N. de F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.

PEREIRA DE ABREU, D. A.; CRUZ, J. M.; PASEIRO LOSADA, P. Active and intelligent packaging for the food industry. **Food Reviews International**, v. 28, p. 146-87, 2012.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 38, n. 8, p. 859-865, 2005.

RIVERO, S.; GARCIA, M.A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 531-539, 2009.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; HERNÁNDEZ, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1302-1310, 2011.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F. F.; NÓBREGA, J. E.; JÚNIOR, M. A. W.; BARBOSA, K. B. F.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R. M. A.; WÜRLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA®2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, v. 20, p. 85-89, 2009.

SINHA, S.; CHAND, S.; TRIPATHI, P. Microbial degradation of chitin waste for production of chitosanase and food related bioactive compounds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, p. 125-133, 2014.

YADAV, H. K. S.; JOSHI, G. B.; SINGH, M. N.; SHIVAKUMAR, H. G. Naturally occurring chitosan and chitosan derivatives: a review. **Current Drug Therapy**, v. 6, n. 1, p. 2-11, 2011.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. 45 - 51, 2005.



---

*Agroindústria Tropical*



MINISTÉRIO DA  
**AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO**

